Zur Sauerstoffbindung des Blutes von Rana ridibunda Pall., Rana lessonae Cam. und Rana esculenta L. (Ranidae, Anura) bei normaler und erniedrigter Sauerstoffspannung

Von HERBERT NOPP und HEINZ TUNNER

Mit 2 Abbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung der mathem.-naturw. Klasse am 26. April 1985 durch das w. M. WILHELM KÜHNELT)

Einleitung

Die mitteleuropäischen Wasserfrösche umfassen die Arten *Rana ridibunda* und *Rana lessonae* sowie deren Hybride, *Rana esculenta*. Die beiden Arten unterscheiden sich in zahlreichen morphologischen und biologischen Merkmalen (vgl. Symposium 1979, in: Mitt. Zool. Mus. Berlin, 55, 1–229, 1979). Diploide Hybriden nehmen zwar in vielen Merkmalen eine intermediäre Position ein, ihre hybride Konstitution führt aber vielfach zu mehr oder weniger schweren Fortpflanzungsstörungen. Nun weisen aber Verbreitung und Häufigkeit gerade die hybride *R. esculenta* als ein offensichtlich sehr erfolgreiches Taxon aus. Es müssen demnach Faktoren existieren, welche die Fortpflanzungsschwäche kompensieren. Einige dieser Faktoren sind bekannt: Beispielsweise legt *R. esculenta*, bezogen auf das Körpergewicht, mehr Eier als *R. ridibunda* oder *R. lessonae* (BERGER und UZZELL, 1980). Auch ließ sich bei *R. esculenta* eine erhöhte Toleranz gegenüber niedrigen Sauerstoffspannungen nachweisen (TUNNER und NOPP, 1979). Sucht man nach einer Erklärung für diese im Hinblick auf eine Überwinterung im Wasser wichtige physiologische Heterosis, so könnten dafür mehrere Ursachen in Frage kommen, z. B. eine unterschiedliche Resistenz gegen Zwischenprodukte anaerober Energiegewinnung oder eine günstigere O_2-Affinität des Hybridblutes gegenüber dem der Elternarten (vgl. MANWELL et al., 1963; POWERS et al., 1979; TETENS and LYKKEBOE, 1981). Eine Bestimmung der L-Lactat-, Succinat- und Alaninanreicherung in der Beinmuskulatur jener Frösche, die von TUNNER und NOPP (1979) in den O_2-Toleranzversuchen verwendet wurden, erbrachte zwar eine Anhäufung von L-Lactat (von 4 μg auf über 30 μg/g Frischgewicht), jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Taxa (VOGEL unpubl., vgl. auch JONES and MUSTAFA, 1973). Die gefundenen Toleranzunterschiede dürften demnach nicht auf eine unterschiedliche Resistenz gegen Zwischenprodukte des anaeroben Stoffwechsels zurückzuführen sein.

Im folgenden soll über erste Versuche zur Beantwortung der Frage nach Vorteilen der Sauerstoffaffinität des Hybridblutes als mögliche Ursache der beobachteten Heterosis bei *R. esculenta* berichtet werden.

Material und Methode

Die 39 Versuchstiere (13 Individuen von jedem der genannten Taxa) stammen aus Niederösterreich (*R. ridibunda* aus einer reinen *ridibunda*-Population) bzw. aus dem Burgenland (*R. lessonae* und *R. esculenta* aus einer *lessonae*+*esculenta*-Mischpopulation; vgl. UZZELL and BERGER, 1975). Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn (zwei bis vier Tage nach dem Fang) bei Freilandtemperaturen und natürlicher Tageslänge in 25-Liter-Kunststoffbehältern, halb gefüllt mit feuchten Schaumstoffstücken, gehalten.

Zunächst wurden vier Tiere von jedem Taxon sofort auf Blut-pH, O_2-Dissoziationskurve und Hämoglobingehalt hin untersucht (erste Versuchsserie; September 1983). Das Blut von je drei weiteren Tieren, die zwei bis drei Tage hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, wurde anschließend in gleicher Weise analysiert. Während der Exposition waren die Tiere gemeinsam in einem mit feuchten Schaumstoffstücken locker gefüllten 6-Liter-Gefäß untergebracht. Das Inkubationsgefäß befand sich in einem Klimaschrank (10° C, natürliche Tageslänge) und wurde mit Flaschengas durchströmt (5 l/h, pO_2 = 7,5 mm Hg, Rest N_2; befeuchtet durch zwei Waschflaschen, vortemperiert durch eine Kühlschlange innerhalb des Klimaschrankes). Im Oktober/November 1983 (zweite Versuchsserie) wurden alle verwendeten Tiere vier bis fünf Wochen im Klimaschrank bei natürlicher Tageslänge und 7,5° C inkubiert; ein Teil (drei Tiere von jedem Taxon) bei normalem O_2-Gehalt (ca. 150 mm Hg), ein weiterer Teil (wieder drei Tiere je Taxon) bei hypoxischen Bedingungen (Durchströmung mit Flaschengas, pO_2 = 16 mm Hg, Rest N_2). Die Sauerstoffspannung entspricht ungefähr dem P_{50} der Versuchstiere. Am Ende dieser Inkubationsperiode wurden alle 18 Tiere in willkürlicher Reihenfolge innerhalb einer Woche (drei bis vier Tiere/Tag) untersucht: Unter Äthernarkose wurde das jeweilige Tier ventral eröffnet und mit einer heparinisierten 500-μl-Hamiltonspritze 120–170 μl Blut aus dem Ventrikel entnommen. 100 μl Blut wurden in 15 ml Phosphatpuffer (66 mM, pH = 7,4) suspendiert und 0,5 ml Saponinlösung zur Hämolyse zugesetzt (0,5 g Saponin in 2 ml NH_4OH 25 %; A. dest. ad 100 ml). Zellwände, Kerne usw. wurden zehn Minuten lang bei ca. 5000 g abzentrifugiert und der klare Überstand in ein Laue-Tonometer (500 ml Volumen) übergeführt, wo er jeweils zehn bis zwölf Minuten mit dem jeweiligen Gasgemisch äquilibriert und dann die Extinktion photometrisch bestimmt wurde (Bausch & Lomb Spectronic 20; 470 nm; Meßtemperatur 22° C). Die O_2-Dissoziationskurven jeweils dreier artgleicher und gleich vorbehandelter Individuen wurden gemittelt und graphisch dargestellt (Abb. 1, 2). Weitere 20 μl des Froschblutes wurden zur photometrischen Hämoglobinbestimmung herangezogen (20 μl Blut zu 5 ml Reaktionslösung: 50 mg KCN, 200 mg $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 g $NaHCO_3$, A. dest. ad 1000 ml); Messung bei 540 nm im obengenannten Photometer. Das restliche Blut (nur zweite Versuchsserie) wurde in die Elektrodenkammern eines Mikrogasanalysators (Instrumentation Labo-

ratories IL 313, 314, 327) eingesaugt und bei 22° C pO_2, pCO_2 und pH bestimmt.

Da aus Naturschutzgründen nur je drei (bzw. im ersten Fall vier) Individuen pro Taxon und Versuchsbedingung für diese erste, orientierende Studie verwendet wurden, war eine statistische Absicherung der Daten vorläufig nicht möglich – der prinzipiell ähnliche Verlauf der O_2-Dissoziationskurven jeweils taxonomisch und nach der Vorbehandlung zusammengehörender Individuen gewährt aber eine gewisse Sicherheit.

Ergebnisse

a) Sauerstoffdissoziationskurve

Die O_2-Dissoziationskurven der 1. Versuchsserie sind in Abb. 1 A wiedergegeben: Bei frisch gefangenen Individuen liegt die O_2-Dissoziationskurve von *R. esculenta* zwischen jenen von *R. lessonae* und *R. ridibunda.* Die P_{50}-Werte (*R. lessonae* ~12, *R. esculenta ~13,5, R. ridibunda* ~18 mm Hg) stimmen größenordnungsmäßig mit den entsprechenden Literaturangaben überein (z. B. WOLVEKAMP, 1932; WOLVEKAMP und LODEWIJKS, 1934; MCCUTCHEON and HALL, 1937; KIRBERGER, 1953; STRAUB, 1957). Nach relativ kurzzeitiger Exposition an erniedrigte O_2-Spannung (7,5 mm Hg innerhalb von zwei Tagen, 10° C; Abb. 1 B) erscheint die O_2-Dissoziationskurve von *R. lessonae* nach rechts verschoben, wodurch das *R. esculenta*-Blut die günstigste O_2-Affinität aufweist; außerdem lassen alle drei Mittelwertkurven (deutlicher noch die neun zugrundeliegenden Einzelkurven) einen eher hyperbolischen als sigmoidalen Verlauf erkennen, was auf fehlende bzw. gehemmte

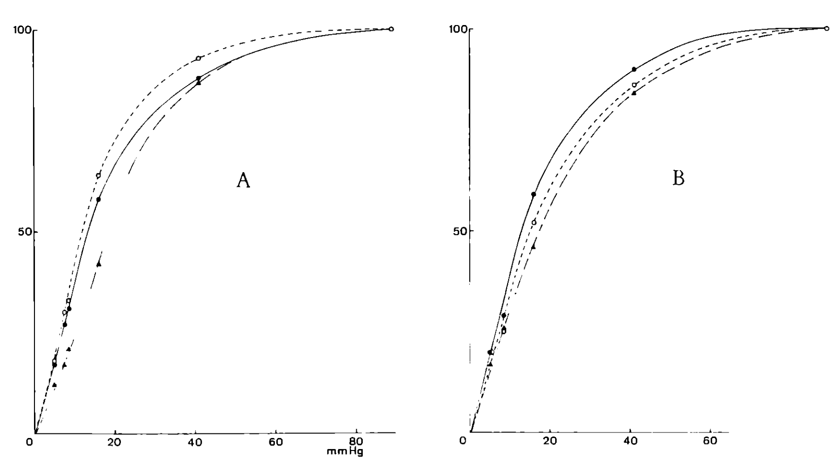


Abb. 1: Sauerstoffdissoziationskurven der 1. Versuchsserie.
A: frisch gefangene Tiere, B: 2–3 Tage bei pO_2 = 16 mm Hg. Ordinate: 0–100 % Hb-O_2; Abszisse: pO_2.
– o – *R. lessonae*, –●– *R. esculenta*, –▲– *R. ridibunda.*

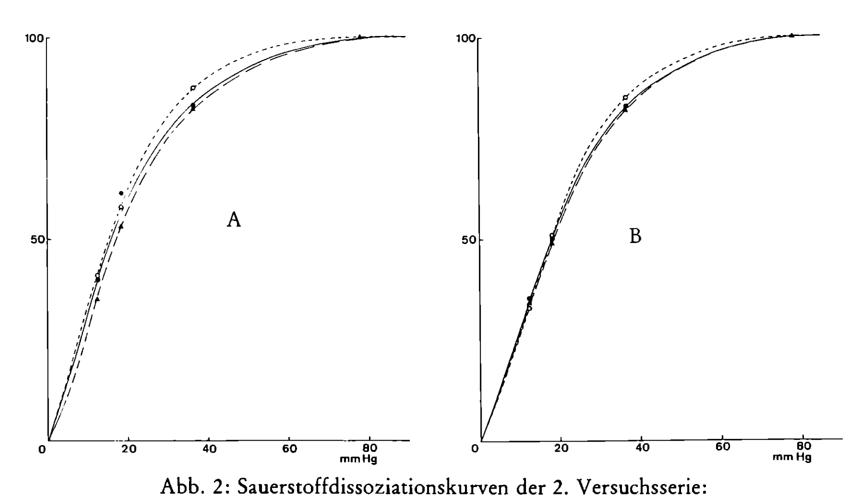


Abb. 2: Sauerstoffdissoziationskurven der 2. Versuchsserie:
4–5 Wochen bei 7,5° C.
A: normoxisch (pO_2 = 150 mm Hg), B: hypoxisch (pO_2 = 16 mm Hg). Sonst wie Abb. 1.

Kooperativität schließen läßt. Die O_2-Dissoziationskurven der 2. Versuchsserie (vier Wochen bei 7,5° C, pO_2 = 16 mm Hg; Abb. 2 A, B) bestätigen zum Teil die Ergebnisse der 1. Serie: Auch bei länger andauernden hypoxischen Bedingungen sehen die Kurven etwas hyperbolischer aus als diejenigen der Kontrolltiere, insgesamt verlaufen sie etwas flacher als die der Abb. 1 A; die Kurven von *R. lessonae* und *R. esculenta* sind nahe an die von *R. ridibunda* herangerückt, von einer günstigeren Position der *R. esculenta*-Kurve ist nichts zu bemerken.

b) Hämoglobingehalt

Die Hämoglobingehalte lagen im Mittel bei 8,0 bis 9,5 g/100 ml Blut (Extremwerte 4,9 und 10,3) und stimmen damit größenordnungsmäßig gut mit entsprechenden Literaturangaben überein (LEFTWICH and BURKE, 1964). Wegen der fehlenden statistischen Absicherung der vorhandenen Unterschiede sei auf eine tabellarische Wiedergabe verzichtet; bemerkenswert erscheint jedoch die Tatsache, daß bei allen drei Taxa in der 1. Versuchsserie die Hb-Werte der hypoxischen Individuen deutlich niedriger lagen als die Werte der normoxischen Tiere, während es sich in der 2. Serie genau umgekehrt verhielt (vgl. Diskussion).

c) pO_2, pCO_2, pH

Aus den gleichen Gründen wie unter b) wird auf eine Tabelle verzichtet. pO_2 und pCO_2 ließen keine Unterschiede erkennen, der pH stieg (!) aber bei allen drei Taxa unter hypoxischen Bedingungen um 0,1 bis 0,2 pH-Einheiten an.

Diskussion

Versucht man nach diesen wenigen Versuchen eine Antwort auf die eingangs gestellte Frage nach den Ursachen der größeren Hypoxietoleranz von *R. esculenta* zu finden, so sei zunächst auf das in der Einleitung erwähnte Ergebnis hingewiesen, daß die Lactatanhäufung keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Taxa erkennen ließ. Die gefundenen Toleranzunterschiede scheinen danach nicht auf eine unterschiedliche Resistenz gegen Zwischenprodukte anaeroben Stoffwechsels zurückzugehen. Umso mehr gewinnt dadurch die Frage der O_2-Aufnahme und des O_2-Transports bei niedrigen Partialdrucken an Bedeutung. In der Tat legt Abb. 1 B nahe, daß die hybride *R. esculenta* bei hypoxischem Streß Vorteile gegenüber den Elternarten hat. Warum diese Vorteile nicht auch in der 2. Serie auftraten (Abb. 2 B), mag an der unterschiedlichen Versuchstemperatur, dem höheren pO2 oder der längeren Expositionsdauer liegen; zumindest für die Temperatur wird ein wichtiger Einfluß auf die O_2-Affinität (KIRBERGER, 1953; STRAUB, 1957; PFEIFFER, 1968), die Hb-Menge, die Erythrozytenzahl und -größe angegeben (ZEPP, 1923; LEFTWICH und BURKE, 1964; KRÜGER, 1961). Aus dem Vergleich der Hb-Werte der beiden Serien scheint jedenfalls hervorzugehen, daß der Streß bei der 1. Serie (kurzfristige Hypoxie, höhere Temperatur, niedrigerer pO_2) wesentlich größer war (erniedrigte Hb-Werte der hypoxisch exponierten Individuen) – und gerade hier scheint *R. esculenta* Vorteile zu besitzen. Die erhöhten Hb-Werte und pH-Werte der hypoxisch exponierten Tiere der 2. Serie (langfristige Hypoxie, niedrigere Temperatur, höherer pO_2) gegenüber den normoxisch exponierten dürften als Anzeichen einer wirksamen Gegenregulation zu deuten sein (vgl. KIRBERGER, 1953; STRAUB, 1957).

Obschon wir über die Biologie der Wasserfrösche noch relativ wenig wissen, so steht doch außer Zweifel, daß die Hybriden sehr unterschiedliche Umweltgegebenheiten tolerieren, die Elternarten aber eher stenök sind. Besonders deutlich wird die ökologische Plastizität der Hybriden bei der Wahl der bevorzugten Überwinterungsplätze. *R. ridibunda* bleibt im Gewässer, *R. lessonae* hingegen überwintert ausnahmslos am Land; *R. esculenta* aber paßt sich offenbar den lokalen Gegebenheiten an und überwintert entweder wie die eine oder die andere Elternart. Mehrfach konnte bei langandauernder Vereisung und offensichtlich verstärkter Sauerstoffzehrung in Freilandterrarien, aber auch in natürlich besiedelten Gewässern ein hoher Ausfall der im Wasser überwinternden *R. ridibunda* beobachtet werden. Die nachgewiesene günstigere O_2-Affinität des *esculenta*-Blutes lassen das hybride Taxon in der Natur vor allem der Art *R. ridibunda*, in bestimmten Situationen (Abb. 1 B) auch der Art *R. lessonae*, überlegen erscheinen.

Literatur

BERGER, L., and TH. UZZELL: The eggs of European water frogs (*Rana esculenta* complex) and their hybrids. Folia Biol. (Krakow) 28, 3–25 (1980).

JONES, D. R., and T. MUSTAFA: The lactacid oxygen debts in frogs after one hour's apnoe in air. J. Comp. Physiol. 85, 15–24 (1973).
KIRBERGER, CHR.: Temperaturadaptation der Sauerstoffbindung des Blutes von *Rana esculenta* L. Z. vgl. Physiol. 35, 153–158 (1953).
KRÜGER, G.: Der Einfluß der Temperatur auf die Sauerstoffbindung des Froschblutes. Verh. DZG, Zool. Anz. Suppl. 24, 80–83 (1961).
LEFTWICH, F. B., and J. D. BURKE: Blood oxygen capacity in Ranid frogs. Amer. Midland Naturalist 72, 241–248 (1964).
MANWELL, C., C. M. A. BAKER, and W. CHILDERS: The genetics of hemoglobin in hybrids – I. A molecular basis for hybrid vigor. Comp. Biochem. Physiol. 10, 103–120 (1963).
McCUTCHEON, F. H., and F. G. HALL: Hemoglobin in the amphibia. J. Cellul. Comp. Physiol. 9, 191–197 (1937).
PFEIFFER, W.: Gasstoffwechsel der Fische, Amphibien und Reptilien. Fortschr. d. Zoologie 19, 105–140 (1968).
POWERS, D. A., G. S. CREANEY, and A. R. PLACE: Physiological correlation between lactate dehydrogenase genotype and hemoglobin function in killifish. Nature 277, 240–241 (1979).
STRAUB, M: Weitere Untersuchungen zur Temperaturadaptation der Sauerstoffbindung des Blutes von *Rana esculenta* L. Z. vgl. Physiol. 39, 507–523 (1957).
TETENS, V., and G. LYKKEBOE: Blood respiratory properties of Rainbow trout, *Salmo gairdneri:* Responses to hypoxia acclimation and anoxic incubation of blood in vitro. J. Comp. Physiol. 145, 117–126 (1981).
TUNNER, H. G., and H. NOPP: Heterosis in the Common European Water Frog. Naturwiss. 66, 268 (1979).
UZZELL, Th., and L. BERGER: Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda, Rana lessonae,* and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta.* Proc. Acad. Nat. Sci. Philad. 127, 13–33 (1975).
WOLVEKAMP, H. P: Untersuchungen über den Sauerstofftransport durch Blutpigmente bei *Helix, Rana* und *Planorbis.* Z. vgl. Physiol. 16, 1–38 (1932).
WOLVEKAMP, H. P., and J. M. LODEWIJKS: Über die Sauerstoffbindung durch Hämoglobin vom Frosch *(Rana esculenta* und *Rana temporaria).* Z. vgl. Physiol. 20, 382–387 (1934).
ZEPP, P.: Beiträge zur vergleichenden Untersuchung der heimischen Froscharten. Z. Anat. 69, 84–180 (1923).

Anschrift der Verfasser: Institut für Zoologie, Universität Wien, Althanstraße 14, A-1090 Wien.